WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM



Internationale ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7: WO 00/46392 (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **A2** C12Q 1/00 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/00328

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Januar 2000 (17.01.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 04 057.5

DE 2. Februar 1999 (02.02.99)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser PLÜSS-STAUFER AG [CH/CH]; Baslerstrasse 42, CH-4665 Oftringen (CH).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURI, Matthias [CH/CH]; Mätteliweg 20, CH-4852 Rothrist (CH). SCHWARZEN-TRUBER, Patrick [CH/CH]; Nigglisbergstrasse 24, CH-4656 Starrkirch-Wil (CH).
- (74) Anwalt: BEHNISCH, Werner, Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR, Friedrichstrasse 31, D-80801 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT, AU, BA, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HR, HU, ID, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SI, SK, TR, US, YU, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING MICROBIAL CONTAMINATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER MIKROBIELLEN KONTAMINATION

(57) Abstract

The invention relates to a method for quantitatively and/or qualitatively determining the microbial contamination of suspensions, emulsions or dispersions containing minerals and/or pigments and/or fillers and/or fibrous materials, characterised in that one or more organic substances which can be decomposed by micro-organisms is added to a sample of the suspensions, emulsions or dispersions, the sample is mixed, optionally incubated and then centrifuged in order to separate the micro-organisms from the minerals and/or pigments and/or fillers and/or fibrous materials. The number and/or size and/or type of micro-organisms in the supernatant aqueous phase is determined after one or more incubations.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung offenbart ein Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung der mikrobiellen Kontamination von Mineralien und/oder Pigmente und/oder Füllstoffe und/oder Fasermaterialien enthaltenden Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Probe der Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen nach Zugabe einer oder mehrerer durch Mikroorganismen abbaubaren organischen Substanzen, vermischen und wahlweise anschliessender Inkubation zentrifugiert wird, um die Mikroorganismen von den Mineralien und/oder Füllstoffen und/oder Pigmenten und/oder Fasermaterialien abzutrennen und die Anzahl und/oder Grösse und/oder Art der Mikroorganismen in der überstehenden wässrigen Phase nach ein oder mehreren Inkubationen bestimmt wird.

0046392A2 I > BNSDOCID: <WO

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

		ES	Si	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Albanien		Spanien	LT	Litauen	SK	Slowakei
AM	Armenien	FI	Finnland				
АT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
ВJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	ΚZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER MIKROBIELLEN KONTAMINATION

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung der mikrobiellen Kontamination von wäßrigen, Mineralien und/oder Pigmente und/oder Füllstoffe und/oder Fasermaterialien, wahlweise in Kombination mit Polymeren in kolloidaler Form enthaltenden Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen.

Die Bestimmung von Verkeimung und Hygiene-Kontrollen von wäßrigen Suspensionen mit herkömmlichen Methoden sind im wesentlichen alle an die Vermehrungsfähigkeit der nachzuweisenden Mikroorganismen gebunden. Diese Verfahren benötigen naturgemäß Zeit, die zwischen 24 h und mehreren Tagen liegen kann. Für viele Fragestellungen sind diese Zeiträume zu groß, und die Ergebnisse liegen zu spät vor, um in Produktionsprozessen noch lenkend eingreifen zu können. Besonders für die Kontrolle vor dem Versand werden immer wieder Verfahren gefordert, die sich durch ein kurzes Untersuchungsintervall auszeichnen.

So ist beispielsweise das grundlegende Problem der herkömmlichen mikrobiologischen Analysen von aeroben mesophilen Keimen, wie Plate Count oder Easicult, die lange Inkubationszeit von bis zu 48 h. Eine Auswertung und somit eine Bestimmung der Keimzahl ist bei diesen Methoden vor zwei Tagen nicht möglich. Hinzu kommen noch verschiedene andere Einflüsse wie z.B. Nährboden, Partialdruck des Sauerstoffs (aerob/-anaerob), Selektivität, pH und noch vieles mehr.

Es ist deshalb oft nicht möglich, die Keimzahl von Produkten wie Pigmentslurries vor Auslieferung zum Kunden zu bestimmen und durch Zusatz von biozid wirkenden Substanzen lenkend einzugreifen. Durch die langen Transportwege von bis zu 6 Wochen im Hochseeschiff oder der Bahn kann die Pigmentslurry jedoch verderben und unbrauchbar werden. Die weisse Pigmentslurry kann sich grau verfärben und zu stinken beginnen Die preventive Überdosierung von biozid wirkenden Substanzen

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BNSDOCID: <WO_____0046392A2_i_>

zur Pigmentslurry, die heutige einzige Möglichkeit um einen Verderb auszuschliessen ist sehr kostenintensiv, eine Verschleuderung von Resourcen und ökologisch unsinnig. Im weiteren müssen zur Analyse von aeroben mesophilen Keimen und Pilzen zwei verschiedene Ansätze gemacht werden. Weiterhin sind Verdünnungsreihen erforderlich, was die Anzahl der Analysen um ein mehrfaches erhöht.

Gängige Methoden zur Bestimmung von Keimen in der Papier- und Pigmentindustrie sind beispielsweise in Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988, "Bestimmung von aeroben Bakterien und Keime" und in Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.22, Ausgabe 1985, Revision 1988, "Bestimmung von Pilzen" beschrieben. Üblicherweise beträgt die Inkubationszeit, bevor eine Bestimmung durchgeführt werden kann, je ca. 48 Stunden.

Von der Firma Microbial Systems Ltd. wurde der Cellfacts ^R -Teilchenanalysen-Vorrichtung und -Verfahren entwickelt. Nähere Informationen hierüber befinden sich Labor flash 9/96, Zeitung mit Leserdienst für Labor und Forschung, Ott Verlag + Druck AG, Ch-3607 Thun, Schweiz. So wird beispielsweise angegeben, daß der Cellfacts-Analysator auch zur Bestimmung der Anzahl der Keime in Calciumcarbonat-Aufschlämmungen einsetzbar ist. Im Labor der Anmelderin durchgeführte Untersuchungen zeigten jedoch, daß eine derartige Bestimmung in der vom Hersteller beschriebenen Weise nicht oder nur ungenau möglich ist.

Das Meßprinzip des Cellfacts-Analysators beruht auf der Messung von Bakterien, Pilzen und Hefen als Teilchen in einem elektrischen Feld, wobei durch intervallweises Inkubieren der Proben und nachfolgender Messung die Zunahme der Anzahl an Teilchen bestimmt wird und bei exponentiellem Wachstum auf to zurück extrapoliert wird. Dieses Meßprinzip funktioniert auch bei einer "niedrigen" Anzahl an "Fremdteilchen" mit gleichen oder ähnlichen Größen wie die Bakterien, Pilze und

Hefen. Bei Suspensionen und Emulsionen mit einem Anteil an "Fremdteilchen", also von Mineralien, Füllstoffen und/oder Pigmenten, von > 1 Gew.% ist die Anzahl der inerten, in der gleichen Größe wie die Mikroorganismen vorliegenden "Fremdteilchen" von 0,5 - 20 μ m, also der Blindwert t_o , derart hoch, daß eine weitere Zunahme von Keimen durch Vermehrung über eine Zeitspanne von < 10 Stunden im Inkubator nicht mehr detektierbar ist. Das Cellfacts-Analysegerät kann so nicht mehr hinreichend genau messen, und der Hersteller fordert, um eine Anwendbarkeit sicherzustellen, eine Verdünnung der Ausgangslösung.

Eine Zunahme von 10³ Teilchen/ml, bei einem Blindwert von 10³ Teilchen/ml, ist durch das Cellfacts-Analysegerät nicht mehr signifikant erfaßbar. Die geforderte Verdünnung aufgrund der "Fremdteilchen" ist jedoch so groß, daß die Verdünnung der vermehrungsfähigen Organismen, die dadurch natürlich um den gleichen Faktor verdünnt werden, nicht mehr signifikant und das erhaltene Resultat falsch ist. "Fremdteilchen" mit einem Durchmesser von > 20 µm können zudem die Meßzelle von nur 30µm Durchmesser verstopfen. Die "Fremdteilchen" können beispielsweise mineralischer Natur sein wie Calciumcarbonat, synthetischer organischer polymerer Natur wie Polystyrolacrylat-Dispersionen oder natürlicher organischer Natur wie Stärkelösungen oder Hemizellulosen und/oder Cellulosefasern oder eine Kombination aus den obigen Teilchen, wie sie beispielsweise im Kreislauf einer Papierfabrik auftritt.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein schnelles und leistungsfähiges, einfach durchführbares Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung der mikrobiellen Kontamination von wäßrigen, Mineralien und/oder Pigmente und/oder Füllstoffe und/oder Fasermaterialen enthaltenden Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen bereitzustellen, das die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik vermeidet.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1 gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Probe der Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen nach Zugabe einer oder mehrerer durch Mikroorganismen abbaubarer organischer Substanzen und wahlweise anschließender Inkubation zentrifugiert wird, um die Mikroorganismen von den Mineralien und/oder Füllstoffen und/oder Pigmenten und/oder Fasermaterialien abzutrennen und die Anzahl und/oder Grösse und/oder Art der Mikroorganismen in der überstehenden wässrigen Phase nach ein oder mehreren Inkubationen bestimmt wird.

Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen sowie der nachfolgenden Beschreibung und den Ausführungsbeispielen.

Die quantitative und qualitative Bestimmung von Mikroorganismen gehört seit langem zum Stand der Technik. Besondere Schwierigkeiten bereitet jedoch die Bestimmung der mikrobiellen Kontamination dann, wenn eine hohe Konzentration von weiteren Feststoffteilchen wie Mineralien, Pigmenten, Füllstoffen und/oder Fasermaterialien in der zu untersuchenden Probe vorliegt. Da diese "Fremdteilchen" häufig eine ähnliche Größe wie die Mikroorganismen aufweisen, ist üblicherweise nur durch eine hohe Verdünnung der Ausgangsprobe die Anzahl der "Fremdteilchen" zu minimieren. Durch diese hohe Verdünnungsstufen wird jedoch gleichzeitig und unvermeidlich die Anzahl der kontaminierenden Mikroorganismen reduziert, und es ist ein langer Inkubationszeitraum notwendig, um die Anzahl der Mikroorganismen durch Vermehrung so zu erhöhen, das eine sichere Detektion ermöglicht wird.

Es bestand deshalb die Notwendigkeit, ein neues Verfahren der eingangs erwähnten Art zu schaffen, das in wesentlich kürzerer Zeit reproduzierbare und verläßliche Ergebnisse bezüglich der Anzahl, Größe und/oder Art der

Mikroorganismen in der untersuchten Probe liefert.

Überraschend und nicht vorhersehbar wurde gefunden, daß durch die Zugabe abbaubarer organischer Substanzen zur Probe und eine nachfolgende Zentrifugation die Mikroorganismen vom inerten Material ("Fremdteilchen") abtrennbar sind. Üblicherweise haften die Mikroorganismen nämlich bevorzugt an den Mineral-, Pigment-, Füllstoff- und/oder Fasermaterialien an der Oberfläche an und lassen sich nur sehr schwer von der Oberfläche abtrennen. Durch einen einfachen Zentrifugationsschritt sedimentieren zwar die "Fremdteilchen", ziehen jedoch dadurch, daß die Mikroorganismen bevorzugt an diesen Teilchen haften, diese mit in das Sediment, so daß der im Überstand verbleibende Mikroorganismenanteil falsche Werte über den Grad der Verkeimung mit Mikroorganismen liefert.

Erstaunlicherweise konnte gezeigt werden, daß durch die Zugabe von biologisch abbaubaren organischen Substanzen eine Trennung der Mikroorganismen und der Mineralien, Pigmente, Füllstoffe und/oder Fasermaterialien erreicht wird. Bevorzugt ist die durch Mikroorganismen abbaubare organische Substanz ein Nährmedium, das üblicherweise zur Kultivierung der Mikroorganismen eingesetzt wird. Dieses Nährmedium wirkt überraschenderweise als Trennmittel zwischen den Mikroorganismen und den Fremdpartikeln und ermöglicht so überhaupt erst die Abtrennung und Auftrennung beider und stört die weiteren Schritte in der Analyse der Mikroorganism nicht. Nicht, oder nur schwer biologisch abbaubare Stoffe bergen die Gefahr, zwar die Mikroorganismen von den inerten Teilchen zu trennen, aber zugleich hemmend aufs Wachstum von Mikroorganismen zu wirken und somit ein falsches Resultat zu bewirken.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann nicht nur ein Arbeitsschritt, nämlich der Verdünnungsschritt, eingespart werden, sondern zudem wird auch die

Inkubationszeit außerordentlich verkürzt. Weiterhin wird nicht irgendein Trennmittel zugegeben, sondern das Trennmittel wirkt gleichzeitig als Nährlösung, die optimalerweise zur Vermehrung der zu untersuchenden Mikroorganismen einsetzbar ist und in einer bevorzugten Ausführungsform so gewählt wird, daß sie für eine bestimmte, zu untersuchende Mikroorganismenart, beispielsweise für Bakterien, Pilze oder Hefen, spezifisch ist.

Erst durch die Einführung einer durch Mikroorganismen abbaubaren organischen Substanz, bevorzugt in Form einer Nährlösung bzw. eines Nährmediums, und durch die Einführung des Zentrifugationsschrittes wird die erfindungsgemäß gestellte Aufgabe gelöst. Die Analysenzeit wird verkürzt, da in der zu untersuchenden Probe eine geringere Anzahl an "Fremdteilchen" enthalten ist oder sie wird überhaupt erst ermöglicht. Weiterhin kann die Ausgangszahl und der Zuwachs an mikrobiologischen Teilchen durch Inkubation über die Zeit geringer sein als bei Proben mit einem höhen Blindwert, also einer höheren Anzahl an "Fremdteilchen".

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können wäßrige Suspensionen, Emulsionen und Dispersionen untersucht werden, die, unter anderem, Mineralien, Pigmente, Füllstoffe und/oder Fasermaterialien, beispielsweise Cellulosefasern und wahlweise weiterhin Polymere, z.B. natürliche, synthetische oder halbsynthetische Polymere in kolloidaler Form, enthalten. Beispiele für derartige Polymere sind: Styrolbutadien, Styrolacrylat, Melaminharze, Formaldehyd-Harnstoff-Harze, Stärke, Carboxymethylcellulose.

Die zu untersuchenden Proben stammen bevorzugt aus der papierverarbeitenden Industrie. Weitere Einsatzgebiete sind die Pigmentindustrie und die metallverarbeitende Industrie.

Erfindungsgemäß wird eine Probe der auf die mikrobielle Kontamination zu

untersuchenden Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen genommen. Die Menge der entnommenen Probe beträgt im allgemeinen 0,5 - 20 ml, kann jedoch auch darunter oder darüber liegen. Im übrigen ist die Menge der entnommenen Probe für den Erfolg des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht entscheidend.

Zur entnommenen Probe werden durch Mikroorganismen abbaubare organische Substanzen gegeben und miteinander vermischt. Der Anteil der zur Probe zugegebenen bioabbaubaren organischen Substanzen beträgt, pro ml Probe, 0,5 - 50 ml der bioabbaubaren Substanz.

Das Verhältnis von Probevolumen zum Volumen der bioabbaubaren Substanz ist abhängig von der Originalkonzentration der Probe und der Konzentration der bioabbaubaren Substanz in Lösung. Das Verhältnis wird so eingestellt, daß die Menge der bioabbaubaren Substanz so groß ist, daß eine Abtrennung der Pigmente. und/oder Mineralien, Füllstoffe. der und Mikroorganismen zusätzlich der Polymere in kolloidaler Form Fasermaterialien und wahlweise ermöglicht wird. Das jeweils zu ermittelnde optimale Verhältnis von Probevolumen zu Volumen der bioabbaubaren Substanz kann vom Fachmann durch Handversuche ermittelt werden.

Üblicherweise wird die Konzentration der Lösung, enthaltend die bioabbaubaren Substanz, so gewählt, dass das Verhältnis von Probelösung zur die bioabbaubaren Substanz enthaltende Lösung 1:0,1 bis 1:100 beträgt. Das optimale Verhältnis ist stark von der Konzentration und der Zusammensetzung der entsprechenden Probelösung abhängig. Pigment- und/oder Füllstoffsuspensionen mit einem Feststoffgehalt von > 65 Gew.% werden üblicherweise im Verhältnis 1:2 bis 1:10, bevorzugt 1:3, verdünnt. Bei einem Feststoffgehalt von < 65 Gew.% wird üblicherweise im Verhältnis 1:0,1 bis 1:1 verdünnt. In gewissen Fällen, speziell wenn eine sehr hohe Verkeimung erwartet wird, wird üblicherweise im Verhältnis 1:

10 bis 1 : 100 verdünnt. Der gewählte Verdünnungsfaktor ist in der späteren Berechnung der Verkeimung zu berücksichtigen oder im Resultat speziell zu vermerken.

Zu den bioabbaubaren organischen Substanzen gehören insbesondere die Gruppe der Nährmedien, die für eine bestimmte, zu untersuchende Mikroorganismenspezies spezifisch sind. Nährmedien enthalten bevorzugt eine Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphat- und/oder Schwefelquelle sowie wahlweise Mineralstoffe, Wuchsstoffe und/oder Vitamine. Weitere Stoffe können dem Nährmedium zugefügt werden, falls dies für das optimale Wachstum der Mikroorganismen erforderlich ist. Bevorzugte, erfindungsgemäß einsetzbare Nährmedien werden nachfolgend genauer beschrieben.

Nach Zugabe des Nährmediums können wahlweise ein oder mehrere Inkubationsschritte erfolgen, um die Anzahl der Mikroorganismen in der Probe zu erhöhen. Dies kann speziell für die spätere qualitative Analyse von Vorteil sein. In einer bevorzugten Ausführungsgestaltungsform der Erfindung findet diese Inkubation vor der Zentrifugation jedoch nicht statt, was zu einer deutlichen Zeitersparnis führt.

Um die Mikroorganismen von den Mineralien, Füllstoffen, Pigmenten und/oder Fasermaterialien abzutrennen, erfolgt nach Zugabe des Nährmediums und dem sich wahlweise anschließenden Inkubationsschritt ein Zentrifugationsschritt. Die Zentrifugation wird so durchgeführt, daß die überwiegende Anzahl der Mikroorganismen, d.h. über 50%, von den "Fremdstoffteilchen", also den Mineralien, Füllstoffen, Pigmenten, Polymeren und Fasermaterialien, abgetrennt werden. Die Zentrifugation muß so durchgeführt werden, daß sich die Mikroorganismen in der oberen Phase ansammeln, während die Fremdstoffteilchen sedimentieren. Zu diesem Zweck wird die Zentrifugation bevorzugt bei 100 bis 1500 g, bevorzugt 200 bis 1200 g und

和糖 不

insbesondere bevorzugt 600 bis 1000 g, durchgeführt. Das Schwerefeld wird in Abhängigkeit von den abzutrennenden Mineralien, Füllstoffen, Pigmenten und Fasermaterialien bzw. in Abhängigkeit von den abzutrennenden Mikroorganismen eingestellt.

Die optimale Sedimentationszahl kann vom Fachmann aufgrund von Versuchen ermittelt werden. Die Zentrifugation selbst wird für einen Zeitraum von 1 bis 30 Minuten, bevorzugt 2 bis 15 Minuten und insbesondere bevorzugt 5 bis 10 Minuten, durchgeführt. Die optimale Zentrifugationszeit kann vom Fachmann durch Laborversuche ermittelt werden.

Als Mineralien und/oder Füllstoffe und/oder Pigmente werden bevorzugt verwendet: Elemente der zweiten und/oder dritten Hauptgruppe und/oder der vierten Hauptgruppe und/oder der vierten Nebengruppe des Periodensystems der Elemente, insbesondere Calcium und/oder Silicium und/oder Aluminium und/oder Titan und/oder Barium enthaltende Verbindungen und/oder organische Pigmente.

Bevorzugt eingesetzt werden als Mineralien, Füllstoffe und Pigmente Kaolin und/oder Aluminiumhydroxid und/oder Titanoxid und/oder Bariumsulfat und/oder Polystyrolhohlkugeln und/oder Formaldehydharze und/oder Calciumcarbonat enthaltende Mineralien und/oder Füllstoffe und/oder Pigmente, insbesondere natürliche Calciumcarbonate und/oder Marmor und/oder Kalk und/oder Dolomit und/oder Dolomit enthaltende Calciumcarbonate und/oder synthetisch hergestellte Calciumcarbonate, sogenannte präzipitierte Calciumcarbonate.

Der die Mikroorganismen enthaltende Überstand wird abgenommen und kann dann direkt einer quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung der mikrobiellen Kontamination zugeführt werden. Bevorzugt schließen sich hier ein oder mehrere Inkubationsschritte an, um die Anzahl der Mikroorganismen im Überstand zu

vermehren. Dieser Vermehrungsschritt erfolgt bei einer für die Mikroorganismen günstigen Inkubationstemperatur, die von der Art der zu vermehrenden Organismen abhängt. Bevorzugte Inkubationstemperaturen liegen im Bereich von 20 bis 37°C, weiterhin bevorzugt 28 bis 34°C und insbesondere bevorzugt 31,5 bis 32,5°C. Die jeweils notwendigen Inkubationstemperaturen sind dem Fachmann bekannt und können entweder aus Nachschlagewerken oder durch Versuche ermittelt werden.

Die Gesamtzeit der einzelnen Inkubationszeiten bei 30°C Inkubationstemperatur beträgt bei einer Verkeimung von weniger von als 10⁵ Keimen/ml Probe bis zu 12 Stunden, bei einer Verkeimung von mehr als 10⁵ Keimen/ml Probe aber weniger als 10⁶ Keimen/g bis zu 6 Stunden, bei einer Suspension mit ursprünglich 60-80 Gew.-% Feststoffanteil mit einer Verkeimung von mehr als 10⁵ Keimen/ml (unter Verwendung von Tryptic Soy Broth Agar) bis zu 3 Stunden.

Die Summe der einzelnen Inkubationsschritte bei 30°C beträgt bei einer Verkeimung von weniger als 10⁵ Keimen/ml Probe 2 bis 6, bei einer Verkeimung von mehr als 10⁵ Keimen/ml Probe aber weniger als 10⁶ Keimen/g 2 bis 4, bei einer Suspension mit ursprünglich 60-80 Gew.-% Feststoffanteil mit einer Verkeimung von mehr als 10⁵ Keimen/ml (unter Verwendung von Tryptic Soy Broth Agar) 2 bis 3.

Die einzelnen Inkubationszeiten bei 30°C Inkubationstemperatur beträgt bei einer Verkeimung von weniger als 10⁵ Keimen/ml Probe 1 bis 12 Stunden, bei einer Verkeimung von mehr als 10⁵ Keimen/ml Probe aber weniger als 10⁶ Keimen/g 1 bis 6 Stunden, bei einer Suspension mit ursprünglich 60-80 Gew.-% Feststoffanteil mit einer Verkeimung von mehr als 10⁵ Keimen/ml (unter Verwendung von Tryptic Soy Broth Agar) 1 bis 2 Stunden.

Zur quantitativen bzw. qualitativen Bestimmung der so erhaltenen Mikroorganismen stehen verschiedene aus dem Stand der Technik bekannte Methoden zur

NSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

Verfügung. Insbesondere bevorzugt wird erfindungsgemäß die Cellfacts^R-Analyse oder die ATP-Methode. Andere Verfahren stehen zur Verfügung und sind dem Fachmann bekannt. Die bevorzugten Verfahren werden in den nachfolgenden Beispielen näher beschrieben.

Nach Durchführen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine qualitative und/oder quantitative Bestimmung der Mikroorganismen möglich. Unter qualitativer Bestimmung ist zunächst eine Grobunterscheidung zwischen den Gruppen Pilze, Hefen und Bakterien zu verstehen. Nach Eichung der Cellfacts^R-Analyse mit speziellen Mikroorganismen, beispielsweise speziellen Bakterien, ist auch eine weitere Spezifizierung in den einzelnen Unterarten möglich. Die qualitative Analyse über beispielsweise das Cellfacts^R-Verfahren findet aufgrund einer Differenzierung nach Grösse bzw. Volumen einer einzelnen Zelle statt.

Die Art der als Trennmittel eingesetzten Nährmedien hängt insbesondere von dem abzutrennenden und zu vermehrenden Mikroorganismus ab. Bevorzugt werden solche Nährmedien eingesetzt, die ein selektives Wachstum der zu bestimmenden Keime ermöglichen und das Wachstum anderer, nicht zu bestimmender Keime möglichst unterdrücken. Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare Nährmedien sind Tryptone Azolectin/Tween 20 (TAT) Broth Agar, Glukoselösung, Pepton/Casein, Nutrient Broth, bevorzugt Tryptic Soy Broth Agar. Die Zusammensetzung der Nährmedien ist im Anhang an diese Beschreibung angeführt.

Die Konzentration des Nährmediums für die Mikroorganismen liegt vorzugsweise bei 0,1 bis 10 Gew.-%, vorteilhafter bei 2 bis 5 Gew.-% und insbesondere vorteilhaft bei ca. 3 Gew.-%.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist sowohl eine qualitative als auch eine

BNSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

quantitative Bestimmung der Bakterien, Pilze und Hefen möglich. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt eine derartige Analyse in einem Schritt.

Nach der Abtrennung der Mikroorganismen von den Mineralien, Füllstoffen, Pigmenten und/oder Fasermaterialien, also den "Fremdstoffen", werden ein oder mehrere, bevorzugt zwei bis fünf Inkubationsschritte durchgeführt, um die Zahl der im Probenüberstand befindlichen Mikroorganismen zu vermehren.

Mehrmalige Inkubationen erfolgen in Intervallen, d.h. die Messung der Kontamination wird nach der Zeit t_{0+x} je wiederholt. Hierdurch ist es möglich, die Inkubationszeit und die Inkubationsintervalle zu begrenzen. Zu dem Zeitpunkt, bei dem ein exponentielles Wachstum ersichtlich ist, wird zurück extrapoliert und auf die Zeit t_o gerechnet. Ein hoher ursprünglicher Verkeimungsgrad wird zu einem früher feststellbaren und berechenbaren Wachstum führen, so daß auf nachfolgende Inkubationsintervalle verzichtet werden kann.

Die Inkubationszeit bei einer Verkeimung von weniger als 10⁵ Keimen/ml Probe beträgt bis zu 12 Stunden, bei einer Verkeimung von weniger als 10⁶ Keimen/ml bis zu 6 Stunden, bei einer Suspension mit ursprünglich 60-80 Gew.-% Feststoffanteil mit einer Verkeimung von mehr als 10⁵ Keimen/ml Probe bis zu 3 Stunden, wobei im letzteren Fall bevorzugt Tryptic Soy Broth Agar eingesetzt wird. Die in Abhängigkeit vom Kontaminationsgrad mit Mikroorganismen anzuwendende Inkubationszeit kann vom Fachmann durch einfache Handversuche ermittelt werden. Je geringer der ursprüngliche mikrobielle Kontaminationsgrad der Probe ist, desto länger müssen die Inkubationszeiten gewählt werden und umgekehrt. Der ursprüngliche Feststoffanteil der Suspension beeinflußt die Inkubationszeit nicht direkt.

Nachfolgend wird anhand von Vergleichsbeispielen und Ausführungsbeispielen die Erfindung näher erläutert. Weitere Abwandlungen der Erfindung können vom

Fachmann aufgrund der vorliegenden Beschreibung in Verbindung mit den anliegenden Patentansprüchen sowie aufgrund des vorauszusetzenden Fachwissens durchgeführt werden. Die Erfindung ist nicht auf die vorliegenden Beispiele beschränkt.

Keimzahlbestimmung mit dem Cellfacts^R Teilchenzähler

Die Mikrooganismen aus der Suspension und/oder Emulsion und/oder Dispersion werden erfindungsgemäß durch eine Meßpore mit definiertem Durchmesser mittels Vakuum gesaugt. An dieser Pore (Kapillare, 30µm) liegt eine Spannung (Volt) an. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolatoren betrachtet werden können kommt es beim Durchtritt einer Zelle durch die Meßpore zu einer meßbaren Widerstandserhöhung, deren Größe vom Volumen der Zelle abhängt. Der Stromimpuls ist direkt proportional zum Volumen. Durch Inkubation der Proben können kleine Differenzen im Wachstum der Zellen gemessen werden. d.h. bei Zellteilung erhöht sich die Anzahl der Teilchen proportional. Da die Funktion des Zellwachstums exponentiell ist, kann nach dem Erkennen des Erreichens der exponentiellen Phase auf die Ausgangskonzentration zurück extrapoliert werden. Die Bestimmungszeit für CaC0₃-Talk- und Kaolinslurries sowie andere Stoffe (z.B. Kühlschmierstoffe, Siebwasser, kolloidal suspendierte Stärke etc.) liegt durch die erfindungsgemäße Präparation der industriellen Proben und unter Anwendung der obigen Methode bei nur 2 - 12 Stunden anstatt wie beim Stand der Technik bei 24 - 48h.

Dies erlaubt ein rechtzeitiges Eingreifen mit Konservierungsstoffen vor einer hohen Kontamination und/oder dem Verderb der Ware.

BNSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

Beispiele zum Stand der Technik

1. Beispiel, Calciumcarbonat Slurry

A) Keimzahlbestimmungen nach Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988, "Bestimmung von aeroben Bakterien und Keime" und nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.22, Ausgabe 1985, Revision 1988, "Bestimmung von Pilzen"

Vorgehensweise

3 ml einer 77.5 Gew.-% wässerigen Aufschlämmung von natürlichem, gemahlenem Marmor aus Norwegen (90 Gew.-% der Teilchen < 2 μ m, 65 Gew.-% der Teilchen < 1 μ m), dispergiert mit 0.65 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats wurden nach der Methode "Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen", Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988, analysiert.

Resultat:

Die Keimzahlbestimmung ergab nach 48 Stunden Inkubationszeit: 3.0×10^6 aerobe mesophile Keime / ml Suspension. Pilze wurden mit dem verwendeten Nährmedium für aerobe mesophile Keime nicht gefunden. Nach der im Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.22, Ausgabe 1985, Revision 1988, "Bestimmung von Pilzen" beschrieben Methode wurden < 10^2 Pilze/ml gefunden.

VSDOCID: <WO____0046392A2_I_>

B) Keimzahlbestimmung durch CellFacts Partikelmessgerät

Vorgehensweise

3 ml der in Beispiel 1 A) verwendeten 77.5 Gew.-% wässerige Aufschlämmung von natürlichem, gemahlenem Marmor aus Norwegen (90 Gew.-% der Teilchen < 2 um, 65 Gew.-% der Teilchen < 1 µm), dispergiert mit 0.65 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats wird in ein steriles Fläschchen pipetiert. Die Probe wird mit 3 ml 3 Gew.%iger TAT Broth Base / Tween 20 Nährlösung versetzt und mit dem CellFacts analysiert. Die Analyse erfolgt in der Weise, dass sofort (Zeit toh) versucht wurde, die Anzahl Teilchen im Cellfacts Gerät zu messen. Da die Teilchenzahl viel zu hoch war, verlangte das Gerät eine Verdünnung der Probe. Nach einer Verdünnung von 1: 10'000 wurde die Teilchenkonzentration vom Gerät akzeptiert, und es konnte der Blindwert (t_{0h}) bestimmt. Nach 2 Std. (Zeit t_{2h}), 4 Std. (Zeit t_{4h}), nach 6 Std. (Zeit t_{6h}) nach 12 Std. (Zeit t_{12h}) Inkubationszeit wurde die Anzahl Teilchen im Cellfacts Gerät gemessen. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Indem man die Anzahl Teilchen gegen den Durchmesser dieser Teilchen aufträgt, kann man nach bestimmten Inkubationszeiten der klaren Phase bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden sind ("Peakerhöhung", y-Achse) und um welche Art von Mikroorganismen es sich handelt z.B. Bakterien, Hefen oder Pilze (mittlerer Teilchen Ø, x-Achse).

Nach 12 Stunden Inkubationszeit wird durch Extrapolation zurück auf die Zeit (_{10h}) die ursprüngliche Verkeimung der Suspension ermittelt. Im Vergleich dazu dient das Resultat aus Beispiel 1 A) Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch. ("Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen", Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988)

Resultat:

Keimzahlbestimmung mit dem Cellfacts Teilchenzähler

1. Tryptic Soy Broth Agar

Prob	Extraktionsmittel	Bestimmungszeit in	aerobe mesophile Keime /
е		Std.	ml Suspension (Peakmax.
			bei Teilchen Ø 1 − 2.5μm)
1	Tryptic Soy Broth Agar	12	< 10 ²

Prob	Extraktionsmittel	Bestimmungszeit in	Pilze / ml Suspension
е		Std.	(Peakmax. bei Teilchen Ø
			5 - 9μm)
1	Tryptic Soy Broth Agar	12	< 10 ²

Aus Beispiel 1 A) und 1 B) geht klar hervor, dass die Bestimmung von Bakterien, Pilzen und Hefen in der obigen Suspension mit den Methoden des Standes der Technik einerseits mit dem CellFacts Gerät nicht möglich, respektive mit < 10² Keimen/ml ein völlig falsches Resultat liefert oder die Bestimmung nach der Methode des Schweizerischen Lebensmittelbuchs 48 Std. dauert.

Beim Cellfacts Gerät führte die notwendige Verdünnung der Probe vermutlich ebenfalls zu einer Verdünnung der anwesenden mikrobiologischen Keime unterhalb deren Nachweisgrenze.

Bei der Bestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch dauert die Analyse 48 Std.

VSDOCID: <WO____0046392A2_[>

C) Keimzahlbestimmung durch ATP Messung

Vorgehensweise

3 ml Probe wie in Beispiel 1 A), 77.5 Gew.-% wässerige Aufschlämmung von natürlichem, gemahlenem Marmor aus Norwegen (90 Gew.-% der Teilchen < 2 µm, 65 Gew.-% der Teilchen < 1 µm), dispergiert mit 0.65 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats werden in ein steriles Fläschchen pipettiert. Die Probe wird mit 3 ml 3 Gew.%iger TAT Broth Base / Tween 20 Nährlösung versetzt und mit dem BioOrbit Luminometer 1253 analysiert. Die Analyse erfolgt in der Weise, dass sofort (Zeit t_{0h}) versucht wurde, die durch das ATP freigesetzte Lichtmenge im BioOrbit Luminometer 1253 zu messen. Ebenfalls wurde eine Probe nach einer Verdünnung von 1:10'000 gemessen. Es wurde so jeweils der Blindwert (t_{0h}) bestimmt. Nach 4 Std. (Zeit t_{4h}), nach 7 Std. (Zeit t_{7h}) und nach 17 Std. (Zeit t_{17h}) Inkubationszeit wurde wiederum die Lichtintensität im BioOrbit 1253 Luminometer gemessen. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Indem man die Lichtintensität nach entsprechender-Inkubationszeit gegen die Inkubationszeit aufträgt, kann man bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden sind (Zunahme der Lichtintensität über die Zeit). Nach einer Inkubationszeit, bei welcher das Wachstum annäherungsweise exponentiell verläuft, kann durch Vergleich des Kurvenverlaufs der einzelnen Proben miteinander die Verkeimung in der Suspension vergleichend ermittelt werden. Es kann dadurch semiquantitativ zwischen "kein Wachstum", "schwaches Wachstum" und starkes Wachstum" unterschieden werden.

Vorgehen beim Messen im Luminometer 1253

- a) Zu Beginn werden von der, wie oben beschrieben vorbereiten Proben je 100 μ l in eine Luminometer-Küvette pipettiert.
- b) Dazu werden 100 μl ATP Releasing Reagent addiert, gut geschüttelt und für eine

- Minute stehen gelassen, damit ATP herausextrahiert werden kann.
- c) Danach werden 500 µl AMR-Reagenz beigefügt und durch Schütteln vermischt.
- d) Die Küvette kann nun in die Messzelle eingeführt werden und die Lichtemission abgelesen werden.

Literatur : Betriebsanleitung BioOrbit Luminometer Ver. 3.0, Mai '95 sowie die Application Note 20 der Firma BoiOrbit OY, FIN 20521 Turku, Finnland

Resultat:

Inkubationszeit in Stunden	Probe Lichtintensität [RLU]	Probe 1:10'000 verdünnt,
	am LCD Display	Lichtintensität [RLU] am
		LCD Display
0	0.001	0.002
4	0.000	0.001
7	0.002	0.002
17	0.001	0.001

Bei diesem Verfahren aus dem Stand der Technik ist nach 17 Stunden kein Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationszeiten ersichtlich, d.h. es muss angenommen werden, dass der Slurry nicht verkeimt ist. Da es sich jedoch um den gleichen Slurry wie in Beispiel 1A (Methode nach Schweizerischem Lebensmittelbuch) handelt und die dort angewendete, anerkannte Methode ein Resultat von 3 x 10^6 Keimen/ml ergibt, wird klar, dass es sich in diesem Beispiel 1C) um ein Fehlresultat handelt, was in der Praxis zu fatalen Folgen , wie Lebensmittelvergiftung oder Verderb von Gütern, führen kann.

Die Bestimmung von Bakterien, Pilzen und Hefen in der obigen Suspension ist mit dieser Methoden des Standes der Technik nicht möglich.

NSDOCID: <WO____0046392A2_I_>

Vermutlich führte die hohe Teilchenkonzentration in der Originalkonzentration der Suspension zu vollständiger Lichtadsorption der durchs ATP freigesetzten Lichtmenge in der Suspension, und die Verdünnung der Probe führte ebenfalls zu einer Verdünnung der anwesenden mikrobiologischen Keime unterhalb deren Nachweisgrenze mit dieser Methode.

Erfinderische Beispiele:

2) Beispiel, Calciumcarbonat Slurry, Analysengerät CellFacts Messgerät

Vorgehensweise

3 ml einer 77.5 Gew.-% wässerigen Aufschlämmung von natürlichem, gemahlenem Marmor aus Norwegen (90 Gew.-% der Teilchen < 2 µm, 65 Gew.-% der Teilchen < 1 µm), dispergiert mit 0.65 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats werden je in ein separates, steriles Fläschchen pipetiert. Eine Probe wird mit 3 ml 3 Gew.%iger TAT Broth Base / Tween 20 Nährlösung versetzt und die zweite Probe mit 3 ml 3 Gew.%iger Tryptic Soy Broth Nährlösung. Anschliessend werden beide Proben 20 sec. gut geschüttelt und anschliessend zentrifugiert. Nach 10 min. Zentrifugation bei 800 g wird die obenstehende klare Phase isoliert und mit dem CellFacts analysiert. Die Analyse erfolgt in der Weise, dass sofort nach der Zentrifugation (Zeit t_{0h}), nach 2 Std. (Zeit t_{2h}), 4 Std. (Zeit t_{4h}) und nach 6 Std. (Zeit t_{6h}) Inkubationszeit die Anzahl Teilchen im Cellfacts Gerät gemessen wird. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Indem man die Anzahl Teilchen gegen den Durchmesser dieser Teilchen aufträgt, kann man nach bestimmten Inkubationszeiten der klaren Phase bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden sind (Peakerhöhung) und um welche Art von Mikroorganismen es sich handelt (Bakterien, Hefen oder Pilze). Nach einer Inkubationszeit, bei welcher das Wachstum exponentiell verläuft, wird durch Extrapolation

zurück auf die Zeit t_{0h} die ursprüngliche Verkeimung der Suspension ermittelt. Im Vergleich dazu wurde eine Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch durchgeführt. ("Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen", Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988)

Resultate:

Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch

Die Keimzahlbestimmung ergab nach 48 Stunden : 3.0×10^6 aerobe mesophile Keime / ml Suspension

Keimzahlbestimmung mit dem Cellfacts Teilchenzähler

- 1. TAT Broth Base / Tween 20 (Poly-oxyethylen-sorbitan-monolaurat)
- 2. Tryptic Soy Broth Agar

Prob	Extraktionsmittel	Notwendige Bestim-	aerobe mesophile
е		mungszeit in Std.	Keime / ml Suspensi-
			on (Peakmax. bei
			Teilchen Ø 1 – 2.5μm)
1	TAT Broth Base / Tween 20	6	1.25 x 10 ⁶
2	Tryptic Soy Broth Agar	4	3.14 x 10 ⁶

Prob	Extraktionsmittel	Bestimmungszeit in	Pilze / ml Suspension
е		Std.	(Peakmax bei Teilchen Ø
			5 - 9μm)
2.	Tryptic Soy Broth Agar	12	< 10 ²

Die, nach dem erfindungsgemässen Verfahren analysierten Proben ergeben eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch, ermittelt nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Beide Proben liegen gegenüber der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch sehr gut innerhalb des Vertrauensbereichs.

Unter Vetrauensbereich wird hier die Abweichung von +- 0.5 log₁₀ einzelner Keimzahlbestimmungen verstanden wie sie von der PHLS Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK, Distribution 070, Seite 6 u. 7 u. Appendix 1, Distribution Date 16. Nov. 1998, Report Date 30. Dez. 1998 erarbeitet wurde.

3) Beispiel Calciumcarbonat Slurry, Analysengerät BoiOrbit 1253 Luminometer

Vorgehensweise

Jeweils 500 ml einer 71.5 Gew.-% wässerigen Aufschlämmung von natürlichem, gemahlenem Marmor (90 Gew.-% der Teilchen < 2 μ m, 65 Gew.-% der Teilchen < 1 μ m), dispergiert mit 0.5 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats, wurden in 1 Liter Glasflaschen abgefüllt. Die eine Probe wurde 3 Tage bei 5°C gelagert (Probe A), die andere wärend 3 Tagen bei 30°C (Probe B). Anschliessend wurden die Proben auf 20°C temperiert und jeweils 3 ml Probe in einem sterilen Fläschchen mit 3 ml des jeweiligen Extraktionsmittel gut vermischt. Nach 10 min. Zentrifugation bei 600 g wird die obenstehende klare Phase isoliert und mit dem BioOrbit 1253 Luminometer auf Lichtemission hin analysiert. Die Analyse erfolgte in der Weise, dass sofort nach der Zentrifugation (Zeit t_{0h}), nach 4 Std. (Zeit t_{4h}), nach 7 Std. (Zeit t_{7h}), lnkubationszeit die Lichtintensität im BioOrbit 1253 Luminometer gemessen wurde. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Indem man die Lichtintensität nach entsprechender Inkubationszeit gegen die Inkubationszeit aufträgt, kann man in der klaren Phase bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden

sind (Zunahme der Lichtintensität über die Zeit). Nach einer Inkubationszeit, bei welcher das Wachstum annäherungsweise exponentiell verläuft, kann durch Vergleich des Kurvenverlaufs der einzelnen Proben miteinander, die Verkeimung in der Suspension vergleichend ermittelt werden. Es kann dadurch semiquantitativ zwischen "kein Wachstum", "schwaches Wachstum" und starkes Wachstum" unterschieden werden. Im Vergleich dazu wurde eine Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch durchgeführt. ("Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen", Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988)

Verwendete Extraktionsmittel:

- Stand der Technik,
 0.9 Gew.%ige NaCl Lösung in dest Wasser, ohne organische, als Nährstoff dienende Substanz.
- Erfinderisch,
 Gew.%ige organische N\u00e4hrl\u00f6sung (Tryptic Soy Broth Agar)

Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch

Probe A: 5 x 10⁴ aerobe mesophile Keime/ g Suspension nach 48 Stunden

Probe B: 7 x 10⁷ aerobe mesophile Keime/ g Suspension nach 48 Stunden

Resultat:

Beurteilung der Verkeimung mit dem BioOrbit Luminometer

Stand der Technik, 0.9 Gew.%ige NaCl - Lösung in dest Wasser

Inkubationszeit in Stunden	Probe 1A, Lichtintensität	Probe 1B, Lichtintensität
	[RLU] am LCD Display	[RLU] am LCD Display
0	0.001	0.001
4	0.002	0.003
7	0.002	0.004
17	0.004	0.007

Beim Verfahren vom Stand der Technik ist nach 17 Stunden kein eindeutiger Unterschied zwischen der schwach und stark verkeimten Suspension möglich.

Erfinderisch, 3 Gew.%ige organische Nährlösung (Tryptic Soy Broth Agar)

Inkubationszeit in Stunden	Probe 2A, Lichtintensität	Probe 2B, Lichtintensität
	[RLU] am LCD Display	[RLU] am LCD Display
0	0.001	0.002
4	0.004	0.006
7	0.007	0.045
17	0.050	0.240

BNSDOCID: <WO_____0046392A2_I_:

Bei Verwendung des erfindungsgemässen neuen Verfahren ist eine Unterscheidung zwischen "schwach" und "stark verkeimter" Suspension bereits nach 7 Stunden möglich.

Bereits nach 17 Stunden ist ebenfalls eine "schwache Verkeimung" signifikant zu erkennen.

In der Literatur und: Betriebsanleitung vom BioOrbit Luminometer Ver. 3.0, Mai '95 sowie in der "Application Note 20" der Firma BoiOrbit OY, FIN 20521 Turku, Finnland werden auch Berechnungsmodelle gezeigt wie von den [RLU]-Werten auf die Boimasse gerechnet werden kann. Weiterhin besteht die Möglichkeit durch "Eichung" mit Suspensionen mit bekanntem Verkeimungsgrad auf eine Keimzahl / ml zu schliessen.

4. Beispiel, US Clay Slurry

Vorgehensweise

3 ml einer 72.8 Gew.-% wässerigen Aufschlämmung von natürlichem, gemahlenem US Clay aus Georgia, USA (95 Gew.-% der Teilchen < 2 µm, 78 Gew.-% der Teil-

ERSATZBLATT (REGEL 26)

NSDOCID: <WO_____0046392A2_L>

chen < 1 µm), dispergiert mit 0.35 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats werden je in ein separates, steriles Fläschchen pipetiert. Eine Probe wird mit 3 ml 3 Gew.%iger TAT Broth Base / Tween 20 Nährlösung versetzt und die zweite Probe mit 3 ml 3 Gew.%iger Tryptic Soy Broth Nährlösung. Anschliessend werden beide Proben 20 sec. gut geschüttelt und anschliessend zentrifugiert. Nach 10 min. Zentrifugation bei 800 g wird die obenstehende klare Phase isoliert und mit dem Cellfacts analysiert. Die Analyse erfolgt in der Weise, dass sofort nach der Zentrifugation (Zeit t_{0h}), nach 2 Std. (Zeit t_{2h}), 4 Std. (Zeit t_{4h}), nach 6 Std. (Zeit t_{6h}), nach 12 Std. (Zeit t_{12h}), Inkubationszeit die Anzahl Teilchen im Cellfacts Gerät gemessen werden. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Indem man die Anzahl Teilchen gegen den Durchmesser dieser Teilchen aufträgt, kann man nach bestimmten Inkubationszeiten der klaren Phase bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden sind (Peakerhöhung) und um welche Art von Mikroorganismen es sich handelt (Bakterien, Hefen oder Pilze). Nach einer Inkubationszeit, bei welcher das Wachstum exponentiell verläuft, wird durch Extrapolation zurück auf die Zeit ton die ursprüngliche Verkeimung der Suspension ermittelt. Im Vergleich dazu wurde eine Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch durchgeführt. ("Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen" Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988)

Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch

Die Keimzahlbestimmung ergab nach 48 Stunden : 5.0×10^5 aerobe mesophile Keime / ml Suspension.

Keimzahlbestimmung mit dem Cellfacts Teilchenzähler

1. TAT Broth Base / Tween 20 (Poly-oxyethylen-sorbitan-monolaurat)

BNSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

2. Tryptic Soy Broth Agar

Prob	Extraktionsmittel	Notwendige Be-	aerobe mesophile Keime
е		stimmungszeit in	/ ml Suspension
		Std.	(Peakmax. bei Teilchen
			Ø 1 − 2.5µm)
1	TAT Broth Base / Tween 20	12	1.12 x 10 ⁵
2	Tryptic Soy Broth Agar	6	5.21 x 10 ⁵

Prob	Extraktionsmittel	Bestimmungszeit in	Pilze / ml Suspension
е		Std.	(Peakmax. bei Teilchen Ø
			5 - 9μm)
2	Tryptic Soy Broth Agar	12	ca. 10 ³

Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren analysierten Proben ergeben eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch, ermittelt nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Beide Proben liegen gegenüber der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch sehr gut innerhalb des Vertrauensbereichs.

Unter Vetrauensbereich wird hier die Abweichung von +- 0.5 log₁₀ einzelner Keimzahlbestimmungen verstanden wie sie von der PHLS Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK, Distribution 070, Seite 6 u. 7 u. Appendix 1, Distribution Date 16. Nov. 1998, Report Date 30. Dez. 1998 erarbeitet wurde.

NSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

5. Beispiel, Siebwasser einer Papiermaschine

Vorgehensweise

3 ml einer 0.5 Gew.-%igen wässerigen Aufschlämmung, enthaltend ca. 0.2 Gew.% natürlichen, gemahlenen Marmor aus Norwegen (60 Gew.-% der Teilchen < 2 μm, 35 Gew.-% der Teilchen < 1 µm), dispergiert mit 0.15 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats und ca. 0.3 Gew.% Cellulosefasern /Sulfit/Sulfat Zellstoff), wie sie in Papierfabriken zur Herstellung von Papier eingesetzt werden und ca. 0.05 Gew.% eines handelsüblichen Polyacrylamids, werden in ein steriles Fläschchen pipettiert. Die Probe wird mit 3 ml 3 Gew. %iger Tryptic Soy Broth Nährlösung versetzt. Anschliessend wird die Proben 20 sec. gut geschüttelt und anschliessend zentrifugiert. Nach 10 min. Zentrifugation bei 1000 g wird die obenstehende klare Phase isoliert und mit dem Cellfacts analysiert. Die Analyse erfolgt in der: Weise dass sofort nach der Zentrifugation (Zeit t_{0h}), nach 1 Std. (Zeit t_{1h}), 2 Std. (Zeit t_{2h}), Inkubationszeit die Anzahl Teilchen im Cellfacts Gerät gemessen werden. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Indem man die Anzahl Teilchen gegen den Durchmesser dieser Teilchen aufträgt, kann man nach bestimmten Inkubationszeiten der klaren Phase bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden sind (Peakerhöhung) und um welche Art von Mikroorganismen es sich handelt (Bakterien, Hefen oder Pilze). Nach einer Inkubationszeit, bei welcher das Wachstum exponentiell verläuft, wird durch Extrapolation zurück auf die Zeit toh die ursprüngliche Verkeimung der Suspension ermittelt. Im Vergleich dazu wurde eine Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch durchgeführt. ("Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen", Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988)

Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch

Die Keimzahlbestimmung ergab nach 48 Stunden : 3.0×10^7 aerobe mesophile Keime / ml Suspension.

Keimzahlbestimmung mit dem Cellfacts Teilchenzähler

1. Tryptic Soy Broth Agar

Prob	Extraktionsmittel	Notwendige Bestim-	aerobe mesophile
е		mungszeit in Std.	Keime / ml Suspensi-
•			on (Peakmax. bei
			Teilchen Ø 1 – 2.5μm)
1	Tryptic Soy Broth Agar	2	3.45 x 10 ⁷

Prob	Extraktionsmittel	Bestimmungszeit in	Pilze / ml Suspension
е		Std.	(Peakmax. bei Teilchen Ø
			5 - 9μm)
1	Tryptic Soy Broth Agar	6	ca. 10⁴

Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren analysierten Proben ergeben eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch, ermittelt nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Die Probe liegt gegenüber der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch sehr gut innerhalb des Vertrauensbereichs.

Unter Vetrauensbereich wird hier die Abweichung von +- 0.5 log₁₀ einzelner Keimzahlbestimmungen verstanden wie sie von der PHLS Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK, Distribution 070, Seite 6 u. 7 u.

NSDOCID: <WO_____0046392A2_1_>

Appendix 1, Distribution Date 16.Nov. 1998, Report Date 30. Dez. 1998 erarbeitet wurde.

6. Beispiel, kolloidale Stärkesuspension

Vorgehensweise

3 ml einer 10 Gew.-%igen wässrigen, kolloidalen Suspension von Maisstärke, wie sie in Papierfabriken im Einsatz ist, wird in ein steriles Fläschchen pipetiert. Die Probe wird mit 3 ml 3 Gew.-%iger Tryptic Soy Broth Nährlösung versetzt. Anschliessend wird die Probe 20 sec. gut geschüttelt und anschliessend zentrifugiert. Nach 10 min. Zentrifugation bei 800 g wird die obenstehende klare Phase isoliert und mit dem Cellfacts analysiert. Diese Analyse erfolgt in der Weise, daß sofort nach der Zentrifugation (Zeit ton) nach 1 Std. (Zeit t1h), 2 Std. (Zeit t2n), Inkubationszeit die Anzahl der Teilchen im Cellfacts Gerät gemessen werden. Die Inkubationstem-peratur betrug 30°C. Indem man die Anzahl Teilchen gegen den Durchmesser dieser Teilchen aufträgt, kann man nach bestimmten Inkubationszeiten der klaren Phase bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden sind (Peakerhöhung) und um welche Art von Mikroorganismen es sich handelt (Bakterien, Hefen oder Pilze). Nach einer Inkubationszeit, bei welcher das Wachstum exponentiell verläuft, wird durch Extrapolation zurück auf die Zeit ton die ursprüngliche Verkeimung der Suspension ermittelt. Im Vergleich dazu wurde eine Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch durchgeführt. ("Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen", Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988)

Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch

Die Keimzahlbestimmung ergab nach 48 Stunden: 4.0×10^6 aerobe mesophile Keime / ml Suspension

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA/EP

BNSDQCID: <WO_____0046392A2_I_>

Keimzahlbestimmung mit dem Cellfacts Teilchenzähler

1. Tryptic Soy Broth Agar

Prob	Extraktionsmittel	Notwendige Bestim-	aerobe mesophile
е		mungszeit in Std.	Keime / ml Suspensi-
			on (Peakmax. bei
			Teilchen Ø 1 – 2.5μm)
1	Tryptic Soy Broth Agar	2	4.22 x 10 ⁶

Prob	Extraktionsmittel	Bestimmungszeit in	Pilze / ml Suspension
е		Std.	(Peakmax. bei Teilchen Ø
			5 - 9μm)
1	Tryptic Soy Broth Agar	12	< 10 ²

Die, nach dem erfindungsgemässen Verfahren analysierte Probe ergibt eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch, ermittelt nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Die Probe liegt gegenüber der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch sehr gut innerhalb des Vertrauensbereichs.

Unter Vetrauensbereich wird hier die Abweichung von +- 0.5 log₁₀ einzelner Keimzahlbestimmungen verstanden wie sie von der PHLS Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK, Distribution 070, Seite 6 u. 7 u. Appendix 1, Distribution Date 16. Nov. 1998, Report Date 30. Dez. 1998 erarbeitet wurde.

NSDOCID: <WO_____0046392A2_1_>

7. Beispiel

Vorgehensweise

3 ml einer 71.5 Gew.-% wässerige Aufschlämmung von natürlichem, gemahlenem Marmor (90 Gew.-% der Teilchen < 2 μm, 65 Gew.-% der Teilchen < 1 μm), dispergiert mit 0.5 Gew.-% eines handelsüblichen Natriumpolyacrylats werden in einem sterilen Fläschchen mit 3 ml des jeweiligen Extraktionsmittel gut vermischt. Nach 10 min. Zentrifugation bei 800 g wird die obenstehende klare Phase isoliert und mit dem Cellfacts analysiert. Die Analyse erfolgt in der Weise dass sofort nach der Zentrifugation (Zeit t_{0h}), nach 2 Std. (Zeit t_{2h}), 4 Std. (Zeit t_{4h}), nach 7 Std. (Zeit t_{7h}), nach 17 Std. (Zeit t_{17h}), und nach 24 Std. (Zeit t_{24h}), Inkubationszeit die Anzahl Teilchen im Cellfacts Gerät gemessen werden. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Indem man die Anzahl Teilchen gegen den Durchmesser dieser Teilchen aufträgt, kann man nach bestimmten Inkubationszeiten der klaren Phase bestimmen, ob lebende Zellen vorhanden sind (Peakerhöhung) und um welche Art von Mikroorganismen es sich handelt (Bakterien, Hefen oder Pilze). Nach einer Inkubationszeit, bei welcher das Wachstum exponentiell verlief, wurde durch Extrapolation zurück auf die Zeit t_{0h} die ursprüngliche Verkeimung der Suspension ermittelt. Im Vergleich dazu wurde eine Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch durchgeführt. ("Bestimmung von aeroben mesophilen Keimen", Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Abschnitt 7.01, Ausgabe 1985, Revision 1988)

Verwendete Extraktionsmittel:

Stand der Technik

- 1. dest. Wasser
- 2. 0.9 Gew.%ige NaCl Lösung in dest Wasser, anorganisches Salz
- 3. 0.8 Gew.%ige Lösung von Poly-oxyethylen-sorbitan-monolaurat (2 mol poly-

oxyethylen), organisches Netzmittel

Beispiel zur Erfindung

4. 3 Gew.%ige organische Nährlösung (Tryptic Soy Broth Agar)

Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch

Die Keimzahlbestimmung ergab nach 48 Stunden : 5.0×10^4 aerobe mesophile Keime / ml Suspension

Keimzahlbestimmung mit dem CellFacts Teilchenzähler

Probe	Extraktionsmittel	Bestimmungszeit in	aerobe mesophile Keime /
		Std.	ml Suspension (Peakmax.
			bei Teilchen Ø 1 – 2.5μm)
1	dest. Wasser	17	2.0 x 10 ³
2	NaCl - Lösung	18	1.6 x 10 ³
3	Poly-oxyethylen- sorbitan-monolaurat	24	> 10 ²
4	organische Nährlö- sung	7	5.6 x 10⁴

Aus den Proben 1 - 3 geht klar hervor, dass einerseits die notwendige Inkubationszeit sehr lang ist bis ein Resultat errechnet werden kann und das Resultat zudem falsch ist. (Vergleich: Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerische Lebensmittelbuch)

Bei den Proben 1 - 3 liegt die Abweichung gegenüber der Keimzahlbestimmung

NSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch weit ausserhalb des Vertrauensbereichs.

Die Proben 1 und 2 enthalten keine organische, als Nährstoff wirkende Substanz. Die Probe 3 enthält eine organische Substanz die nicht als Nährstoff sondern als Hemmstoff dient. Bereits in Beispiel 4-1 war bei Einsatz von Tween 20 gegenüber Beispiel 4-2 eine gewisse Hemmung durch Tween 20 zu erkennen. Die erfindungsgemäss eingesetzte organische, als Nährlösung dienende Substanz konnte jedoch ein Fehlresultat in Beispiel 4-2 verhindern. In Beispiel 7-3 jedoch liegt gegenüber dem Beispiel 7-4 ein fatales Fehlresultat vor!

Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren analysierte Probe 4 ergibt eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch.

Bei der Probe 4 liegt die Abweichung gegenüber der Keimzahlbestimmung nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch sehr gut innerhalb des Vertrauensbereichs.

Unter Vertrauensbereich wird hier die Abweichung von +- 0.5 log₁₀ einzelner Keimzahlbestimmungen verstanden wie sie von der PHLS Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK, Distribution 070, Seite 6 u. 7 u. Appendix 1, Distribution Date 16. Nov. 1998, Report Date 30. Dez. 1998 erarbeitet wurde.

BNSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

Zusammensetzung bevorzugter Nährmedien		
Tryptic Soy Broth		
Bacto-Trypton	17,0 g/l	
Bacto-Soyton	3,0 g/l	
Bacto-Dextrose	2,5 g/l	
Natriumchlorid	5,0 g/l	
Dicaliumphosphat	2,5 g/l	
TAT-Broth Base		
Bacto-Trypton	20,0 g/l	
Azolectin	5,0 g/l	
Nutrient Broth		
Bacto-Beef-Extrakt	3,0 g/l	
Bacto-Peptin	5,0 g/l	
Peptin aus Casein, tryptischer Verdau		
Peptin aus Casein	1,0 g/l	
Natriumchlorid	1,8 g/l	
Plate Count Agar		
Bacto-Trypton	5,0 g/l	
Hefeextrakt	2,5 g/l	
Bacto-Dextrose	1,0 g/i	
Agar Nr. 1	9,0 g/l	
<u>Ethylenglycol</u>		
Ethylenglycol	1,0 g/l	
Azolectin	5,0 g/l	
Natriumchlorid	1,8 g/l	
Glycerin		
Glycerin	1,0 g/l	
Azolectin	5,0 g/l	
Natriumchlorid	1,8 g/l	

VSDOCID: <WO____0046392A2_1_>

PATENTANSPRÜCHE

- 1. Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung der mikrobiellen Kontamination von Mineralien und/oder Pigmente und/oder Füllstoffe und/oder Fasermaterialien enthaltenden Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen dadurch gekennzeichnet, daß eine Probe der Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen nach Zugabe einer oder mehrerer durch Mikroorganismen abbaubarer organischer Substanzen, vermischen und wahlweise anschliessender Inkubation zentrifugiert wird, um die Mikroorganismen von den Mineralien und/oder Füllstoffen und/oder Pigmenten und/oder Fasermaterialien abzutrennen und die Anzahl und/oder Grösse und/oder Art der Mikroorganismen in der überstehenden wässrigen Phase nach ein oder mehreren Inkubationen bestimmt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der mikrobiellen Kontamination um Bakterien und/oder Pilze und/oder Hefen handelt.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Mikroorganismen abbaubare organische Substanz in Form eines Nährmediums für Mikroorganismen zugesetzt wird.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Nährmedium eine Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphat- und/oder Schwefelquelle sowie wahlweise Mineralstoffe, Wuchsstoffe und/oder Vitamine enthält.

- Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation so durchgeführt wird, daß die Mineralien und/oder Füllstoffen und/oder Pigmenten und/oder Fasermaterialien mehrheitlich von den Mikroorganismen abgetrennt werden und daß sich die Mikroorganismen in der oberen Phase befinden.
- Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation bei 100-1.500 g, bevorzugt 200-1.200 g, besonders bevorzugt 600-1.000 g erfolgt.
- Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubationstemperatur 20-37°C, bevorzugt 28-34°C und am vorteilhaftesten 31,5-32,5°C beträgt.
- Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß solche Nährmedien eingesetzt werden, die selektiv das Wachstum der zu bestimmenden Keime ermöglichen.
- 9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Nährmedium Tryptone Azolectin/Tween 20 (TAT) Broth Agar und/oder Glukoselösung und/oder Pepton/Casein und/oder Nutrient Broth, bevorzugt Tryptic Soy Broth Agar, verwendet wird.

- 10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Nährmediums für Mikroorganismen vorzugsweise 0,1-10 Gew.-%, vorteilhafter 2-5 Gew.-%, am vorteilhaftesten 3 Gew.-% beträgt.
- 11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Suspension, Emulsion oder Dispersion weiterhin zusätzlich Polymere in kolloidaler Form enthält.
- 12. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die qualitative und/oder quantitative Bestimmung von Bakterien und/oder Pilzen und/oder Hefen in einer Analyse nebeneinander erfolgt.
- 13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Zentrifugationsschritt für einen Zeitraum von 1 30 Min., bevorzugt 2 15 Min., besonders bevorzugt 10 Min. erfolgt.
- 14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Zentrifugation erhaltene, Mikroorganismen aufweisende Phase durch ein Teilchengrößenanalyseverfahren auf die Menge der Mikroorganismen analysiert wird.
- 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe und Anzahl der Mikroorganismen analysiert werden, indem die

BNSDOCID: <WO _____0046392A2_I_:

Mikroorganismenprobe mit Hilfe eines Vakuums durch eine Meßpore mit definierter Länge und Durchmesser gesaugt wird, wobei zwischen Ein- und Ausgang der Pore eine Spannung anliegt, und bei Durchtritt von Mikroorganismen durch die Probe ein Stromimpuls gemessen wird, der direkt proportional zum Volumen des Mikroorganismus ist und die Zahl der Stromimpulse proportional zur Anzahl der Mikroorganismen ist.

- 16. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Zentrifugation erhaltene, Mikroorganismen aufweisende Phase durch Bestimmung des durch die Mikroorganismen produzierten ATP's auf die Menge der Mikroorganismen analysiert wird.
- 17. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die mikrobielle Kontamination von Dispersionen, Emulsionen und Suspensionen in der metallverarbeitenden Industrie, in der Pigment- und Papierindustrie sowie von Kreislaufwässern der Papierindustrie untersucht wird.

Figur zum Beispiel 3, Seite 24

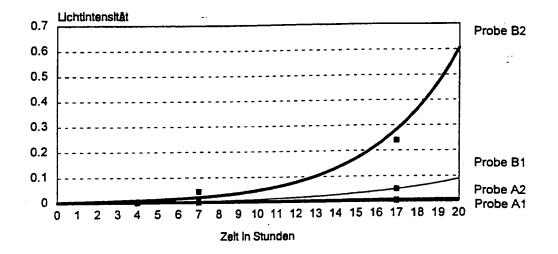


Fig.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BNSDOCID: <WO_____0046392A2_I_>

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum Internationales Büro



1 (1800 BLOOK) 1 (1801) 1 (1814 BLOOK) 1 (1814 BLOOK)

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum 10. August 2000 (10.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer WO 00/46392 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: B01D 21/26, C12N 1/02, C02F 1/38

C12Q 1/04,

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/00328

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. Januar 2000 (17.01.2000)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 199 04 057.5 2. Februar 1999 (02.02.1999) DE

- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PLÜSS-STAUFER AG [CH/CH]; Baslerstrasse 42, CH-4665 Oftringen (CH).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURI, Matthias [CH/CH]; Mätteliweg 20, CH-4852 Rothrist (CH). SCHWARZENTRUBER, Patrick [CH/CH]; Nigglisbergstrasse 24, CH-4656 Starrkirch-Wil (CH).

- (74) Anwalt: BEHNISCH, Werner; Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR, Friedrichstrasse 31, D-80801 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AT, AU, BA, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HR, HU, ID, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SI, SK, TR, US, YU.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 14. Dezember 2000

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

- (54) Title: METHOD FOR DETERMINING MICROBIAL CONTAMINATION
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER MIKROBIELLEN KONTAMINATION

(57) Abstract: The invention relates to a method for quantitatively and/or qualitatively determining the microbial contamination of suspensions, emulsions or dispersions containing minerals and/or pigments and/or fillers and/or fibrous materials, characterised in that one or more organic substances which can be decomposed by micro-organisms is added to a sample of the suspensions, emulsions or dispersions, the sample is mixed, optionally incubated and then centrifuged in order to separate the micro-organisms from the minerals and/or pigments and/or fillers and/or fibrous materials. The number and/or size and/or type of micro-organisms in the supernatant aqueous phase is determined after one or more incubations.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung offenbart ein Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung der mikrobiellen Kontamination von Mineralien und/oder Pigmente und/oder Füllstoffe und/oder Fasermaterialien enthaltenden Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Probe der Suspensionen, Emulsionen oder Dispersionen nach Zugabe einer oder mehrerer durch Mikroorganismen abbaubaren organischen Substanzen, vermischen und wahlweise anschliessender Inkubation zentrifugiert wird, um die Mikroorganismen von den Mineralien und/oder Füllstoffen und/oder Pigmenten und/oder Fasermaterialien abzutrennen und die Anzahl und/oder Grösse und/oder Art der Mikroorganismen in der überstehenden wässrigen Phase nach ein oder mehreren Inkubationen bestimmt wird.

WO 00/46392 A3

BNSDOCID: <WO_____0046392A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 00/00328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12Q 1/04 B01D 21/26 C12N 1/02 C02F 1/38
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12Q B01D C12N C02F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| X | Further documents are listed in the continuation of Box C.

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 816 512 A (BASF AG) 7 January 1998 (07.01.98) page 2, line 1 - line 6 page 2, line 57 - page 3, line 2; claims 1,4,5	1,2,7,11, 12,16,17
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199118 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1991-130876 XP002901039 & SU 1 571 060 A (PROTEIN BIOSYNTHESI), 15 June 1990 (15.06.90) Abstract	1,6,13
	-/	

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" "L" "O" "P"	earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family
Date	of the actual completion of the international search	Date	of mailing of the international search report
•	7 April 2000 (07.04.00)		11 September 2000 (11.09.00)
Nam	ne and mailing address of the ISA/	Autho	rized officer
	European Patent Office	Telen	hone No.

See patent family annex.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/00328

C (Continuati		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO 91 04318 A (TRANCEL CORP) 4 April 1991 (04.04.91) page 1, line 1- page 2, line 21 page 3, line 21 - page 4, line 32: claims 1-3; figure 1	1-10, 13,:15
A	EP 0 724 902 A (PASSAVANT WERKE) 7 August 1996 (07.08.96) page 2, column 1, line 34 - line 47	1
Α .	DE 195 32 802 C (BIOPHIL GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGIE ENERGIE- UND UMWELTTECHNIK MBH) 28 May 1997 (28.05.97) claims 1,9,12	1,17
	•	
	·	
	•	
	·	
'		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO_____0046392A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

Patent document cited in search repo	rt	Publication date		ent familiy ember(s)	Publication date
EP 0816512	Α	07-01-1998	DE	19625137 A	08-01-1998
SU 1571060	Α	15-06-1990			
WO 9104318	Α	04-04-1991	AT AU CA DE DE EP JP US	140033 T 6517890 A 2066761 A 69027686 D 69027686 T 0578631 A 6503466 T 5739033 A	15-07-1996 18-04-1991 21-03-1991 08-08-1996 23-01-1997 19-01-1994 21-04-1998
EP 0724902	Α	07-08-1996	DE	19503120 A	08-08-1996
DE 19532802	С	28-05-1997			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1 _P 00/00328

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C02F1/38 B01D21/26 C12N1/02 IPK 7 C1201/04 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C120 B01D C12N C02F Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. 1,2,7, 11,12, Α EP 0 816 512 A (BASF AG) 7. Januar 1998 (1998-01-07) 16.17 Seite 2, Zeile 1 - Zeile 6 Seite 2, Zeile 57 -Seite 3, Zeile 2; Ansprüche 1,4,5 1,6,13 Α DATABASE WPI Section Ch. Week 199118 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1991-130876 XP002901039 & SU 1 571 060 A (PROTEIN BIOSYNTHESI), 15. Juni 1990 (1990-06-15) Zusammenfassung -/--X Siehe Anhang Patentfamilie Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondem nur zum Verständnis des der * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchts Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen die ser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 1 1, 09, 00 7. April 2000 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016 Mosser

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PC'. _P 00/00328

Kategone ^o	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
aredoue.	Dezeleinung der veronenbiehung, sower enordenkin unter Angus der in Dezacht Kommenden reite	вес. спортия И.
A	WO 91 04318 A (TRANCEL CORP) 4. April 1991 (1991-04-04) Seite 1, Zeile 1 -Seite 2, Zeile 21 Seite 3, Zeile 21 -Seite 4, Zeile 32; Ansprüche 1-3; Abbildung 1	1-10,13, 15
A	EP 0 724 902 A (PASSAVANT WERKE) 7. August 1996 (1996-08-07) Seite 2, Spalte 1, Zeile 34 - Zeile 47	1
Α	DE 195 32 802 C (BIOPHIL GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGIE ENERGIE- UND UMWELTTECHNIK MBH) 28. Mai 1997 (1997-05-28) Ansprüche 1,9,12	1,17

Formbiatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung tie zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen PC _ ZP 00/00328

im Recherchenbencht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0816512	Α	07-01-1998	DE 19625137 A	08-01-1998
SU 1571060	Α	15-06-1990	KEINE	
WO 9104318	А	04-04-1991	AT 140033 T AU 6517890 A CA 2066761 A DE 69027686 D DE 69027686 T EP 0578631 A JP 6503466 T US 5739033 A	15-07-1996 18-04-1991 21-03-1991 08-08-1996 23-01-1997 19-01-1994 21-04-1994 14-04-1998
EP 0724902	Α	07-08-1996	DE 19503120 A	08-08-1996
DE 19532802	С	28-05-1997	KEINE	

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentlamdie)(Juli 1992)

BNSDOCID: <WO_____0046392A3_I_>

THIS PAGE BLANK (USPTO)